热应激通过诱导奶牛乳腺细胞凋亡减少乳蛋白

高胜涛[1]　郭　江[1]　权素玉[1]　南雪梅[1]　卜登攀[1,2,3*]

（1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，动物营养学国家重点实验室，北京 100193;2.中国农业科学院-世界农用林业中心，农用林业与可持续畜牧业联合实验室，北京 100193;3.东北农业大学，食品安全与营养协同创新中心，哈尔滨 150030）

摘　要：本试验旨在研究热应激时乳蛋白含量和产量降低与泌乳相关激素、乳蛋白合成相关信号通路及乳腺细胞凋亡的关系，并揭示热应激引起乳蛋白含量和产量下降的原因。选取 4 头泌乳日龄、体重、产奶量相近的经产健康荷斯坦奶牛作为试验动物。采取 2×2 交叉试验设计，试验共 2 期，每期 18 d（其中预试期和试验期各 9 d），2 期之间间隔 30 d。预试期为热中性环境，自由采食。试验期奶牛随机分为 2 组(*n*=2)，分别为热应激组和配对限饲组。结果表明：1）热应激极显著降低了乳蛋白的含量和产量（*P*<0.01）。2）热应激对酪氨酸激酶（JAK）-信号转导及转录激活因子（STAT）信号通路及 κ-酪蛋白（*CSN*3）基因表达量没有显著影响（*P*>0.05）。3）热应激显著增加了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路中的 *mTOR* 的基因表达量（*P*<0.05），且有增加核糖体 S6 蛋白激酶(*S6K*1)基因表达量的趋势（0.05≤*P*<0.10）。4）热应激增加了乳腺细胞中与细胞凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 3（*CASP*3）、环氧合酶-2（*COX*2）基因的表达量（*P*<0.05），且有增加 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白（*BAX*）基因表达量的趋势（0.05≤*P*<0.10）。综合可知，热应激可能并不是通过调控单个乳腺细胞合成乳蛋白的能力来影响乳蛋白的含量和产量，而是通过诱导乳腺细胞的凋亡，减少可用于乳蛋白合成的乳腺细胞的数量来影响的。

关键字：热应激；乳蛋白；JAK-STAT；mTOR；细胞凋亡

中图分类号：S852.2

热应激可引起牛奶中乳蛋白含量的降低，从而降低夏季牛奶品质[1-2]。探明由热应激直接引起乳蛋白含量下降的原因，对提升夏季热应激时期的乳品质具有非常重要的意义。奶牛

收稿日期：2015-12-15

基金项目：国家自然科学基金（31372341）；十二五国家科技支撑计划（2012BAD12B02-05）；中国农业科学院科技创新工程（ASTIP-IAS07）

作者简介：高胜涛（1990—），男，河北邯郸人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学专业研究。E-mail: gaoshengtao2014@outlook.com

*通信作者：卜登攀，研究员，硕士生导师，E-mail:budengpan@126.com

在热应激条件下通过降低干物质采食量（DMI）和驱动机体内分泌激素的平衡以适应热应激状态[3]，乳蛋白的合成受到激素的调控和驱动[4]，其中主要包括生长激素（growth hormone，GH）、催乳素（prolactin，PRL）、胰岛素（insulin，INS）及类胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factors-1，IGF-1）[5]，这些激素主要通过 Janus 激酶（Janus kinase,JAK）-信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription,STAT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）等信号通路作用于转录和翻译的起始和延伸阶段，来调控蛋白质的合成[5]。

热应激能降低细胞的活力,诱导细胞凋亡[6-8]。通过体外培养乳腺上皮细胞，研究发现高温抑制乳腺上皮细胞正常生长，促使细胞凋亡[7]，还发现热应激上调了乳腺细胞中与 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白（B-cell lymphoma-2-associated X protein，*BAX*）基因（促凋亡基因）的表达量，而 B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，*Bcl*-2）基因（抑制凋亡基因）先上调后下调[9]。此外，通过设置与热应激组采食量保持一致的配对限饲组排除了热应激时采食量下降对牛奶乳蛋白含量的影响，并且发现热应激时 DMI 降低只能解释一部分的乳蛋白含量下降，而剩余部分的乳蛋白含量下降由热应激直接引起[10-12]。

热应激对生产性能、乳成分等方面影响已有大量相关报道。体外培养奶牛乳腺细胞也表明热应激可促进体外培养乳腺细胞的凋亡[7]。但热应激是否通过活体牛乳腺细胞中 JAK-STAT 和 mTOR 通路影响乳蛋白的合成，以及热应激是否促进活体牛乳腺细胞的凋亡目前尚未见报道。本试验目的是研究热应激时乳蛋白含量降低与泌乳相关激素、乳蛋白合成相关信号通路及乳腺组织中细胞凋亡的关系，并通过对非热应激牛限饲处理排除热应激时由于 DMI 下降而造成的间接影响，从中揭示热应激引起乳蛋白下降的直接原因，为缓解热应激时乳蛋白含量下降提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计与饲养管理

选取 4 头泌乳日龄[（101±10) d]、体重[（574±36） kg]、产奶量[（38.0±2.4） kg/d]相近的经产健康荷斯坦奶牛，随机分配到 4 个大家畜环境控制舱（kooland，北京库蓝科技有限公司；4 m×3 m×2.5 m；温度 15~40 ℃；相对湿度 25%~85%；光照 0~800 lx，连续可调）。采取 2×2 交叉试验设计，试验共 2 期，每期 18 d（其中预试期和试验期各 9 d），2 期之间间

隔 30 d。预试期 4 头牛均处于热中性环境[温度 20 ℃；相对湿度 55%；温湿指数（THI）65.5；12 h 光照]，且自由采食。试验期试验动物随机分 2 组(n=2)，分别为热应激（HS）组[温度：06：00—18：00，36 ℃，18：00— 06：00（次日），32 ℃；相对湿度 55%；THI 84.5；12 h 光照]和配对限饲(PRF)组（温度 20 ℃；相对湿度 55%；THI 65.5；12 h 光照），其中热应激组为自由采食，且提供足够量的饲粮。配对限饲组的某天饲喂量（采食量）占该组牛预试期 DMI 平均值百分比与热应激组此前 1 d DMI 占该组牛预试期 DMI 平均值百分比（在 26.8%~61.0%之间）保持一致，即配对限饲组相对于热应激组错后 1 d 开始和结束试验以及采集样品，保证试验期内热应激组和配对限饲组每天 DMI 保持一致。THI 设置参考热应激阈值[13]。

试验期间每天早晚饲喂 2 次（05：00 和 17：00），饲喂同时挤奶，并记录每头牛产奶量。于第 2 天晨饲前收集剩料并称重。所有试验动物自由饮水。根据 NRC（2001）奶牛营养需要量推荐值[14]，配制饲粮，精粗比为 50∶50，其组成及营养水平参见表 1，以全混合日粮（TMR）形式饲喂。代谢室卫生管理按动物营养学国家重点实验室常规程序进行。

表 1　饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of basal diets (DM basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredient	
苜蓿干草 Alfalfa hay	23.98
膨化大豆 Extruded-soybean	2.08
全株玉米青贮 Whole corn silage	26.02
蒸汽压片玉米 Steam-flaked corn	21.99
豆粕 Soybean meal	11.38
菜籽粕 Rapeseed meal	4.22
玉米粉 Corn meal	8.19
石粉 Limestone	1.19
食盐 NaCl	0.38
预混料 Premix1)	0.57
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels2)	
酸性洗涤纤维 ADF	23.28
中性洗涤纤维 NDF	43.34
粗蛋白质 CP	15.64
有机物 OM	93.21
干物质 DM	96.97
粗脂肪 EE	2.33

泌乳净能 NE_L/(MJ/kg) 7.07

1)每千克预混料含有 One kg of premix contained the following：VA 250 000 IU，VD 65 000 IU，VE 2 100 IU，Fe 400 mg，Cu 540 mg，Zn 2 100 mg，Mn 560 mg，Se 15 mg，I 35 mg，Co 68 mg。

2)泌乳净能为计算值，由 CPM-Dairy 3.8.0.1V（美国康奈尔大学、宾夕法尼亚大学、迈纳农业研究所共同研发）计算得出，其余为实测值。NE_L was a calculated value, and was calculated by CPM-Dairy 3.8.0.1V researched and developed by Cornell University, University of Pennsylvania, William H. Miner Agricultural Research Institute], while the others were measured values.

1.2 样品采集

预试期和试验期（试验期配对限饲组相对于热应激组错后 1 d 开始）每天 3 次（07：00、14：00、22：00）记录每头牛的直肠温度、呼吸频率及每个舱的温度、湿度；预试期和试验期每天采集牛奶样品 50 mL（早晚各取 25 mL），乳样加重铬酸钾防腐剂（0.6 mg/mL）混合均匀后于 4 ℃存放；预试期和试验期第 2、4、6、8 天采食后 2~3 h 采集尾动/静脉血液 10 mL，静置 30 min 后 4 ℃，1 500×*g* 离心 20 min，用 1.5 mL EP 管收集血清，-20 ℃保存；预试期和试验期第 2、4、6、8 天采集饲粮样品，于第 2 天晨饲前采集剩料样品；试验期的第 9 天活体采集乳腺组织样品，采集方法参考《反刍动物营养学研究方法》[15]。

1.3 指标测定

饲粮和剩料样品采集后 60 ℃烘干 48 h 测定水分含量（GB/T 6435-1986，强制对流烘箱 UFE400，德国 MEMMERT），烘干样品粉碎过 40 目筛后-20 ℃保存，用于其他指标的测定。饲料常规参照国家标准分析粗灰分（GB/T6438-1992，箱式电阻炉 SRJX-8-13，天津市泰斯特仪器有限公司）、粗脂肪（GB/T 6433-2006，粗脂肪分析仪 Soxtec™AVANTI 2043，丹麦 FOSS）、粗蛋白质（GB/T6432-1994，全自动凯氏定氮仪 FOSS KJELTEC 2300，丹麦 FOSS）。中性洗涤纤维（NDF）和酸性洗涤纤维（ADF）含量参照 Van Soest 等[16]的方法测定，称取 0.5 g 左右样品封装于纤维测定专用滤袋（中国农业大学动物科技学院），使用全自动纤维分析仪（A2000i，美国 ANKOM）洗涤，洗涤时滴加 2 滴淀粉酶处理。

采用红外分光光度法（全自动乳成分分析仪 Minor-78110，丹麦 FOSS）分析乳蛋白含量。血清中 GH、INS、PRL 含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。血清中 IGF-1 含量测定采用上海酶联生物科技有限公司试剂盒测定。

1.4 实时定量 PCR 分析基因表达量

1.4.1 细胞总 RNA 提取

乳腺组织在液氮中研磨后提取乳腺组织总 RNA，采用 NanoDrop1 000 检测 RNA 纯度及 260 和 280 nm 波长下吸光度值的比（$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$），测定值在 1.8~2.0 符合反转录要求。浓度调整至 500 ng/μL，用于后续反转录。

1.4.2 反转录

采用 Prime Script™ RT reagent Kit With gDNA Erase (日本 TaKaRa)试剂盒进行反转录。反转录体系为 10 μL：5×Prime Script RT Master Mix 2 μL，总 RNA 1 μL，无 RNA 酶水 7 μL。反应条件为：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃保存，获得 cDNA，-20 ℃保存备用。

1.4.3 实时定量RCR

以 cDNA 为模板，参照 TaKaRa 的 SYBR Green 说明书进行实时定量 RCR，选用广泛表达转录蛋白（*UXT*）基因为内参。试验中所用基因引物均由华大基因合成，引物序列见表 2。其中催乳素受体（*PRLR*）、胰岛素受体（*INSR*）、*JAK*2、*STAT*5*B*、ets 结构域转录因子 5（*ELF*5）、*mTOR*、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1（*eIF4EBP*1）、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 2（*eIF4EBP*2）、核糖体 S6 蛋白激酶(ribosomal protein S6 kinase，*S6K*1)、*UXT* 基因引物序列参见 Bionaz 等[5]；*D*-冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3（*CASP*3）、环氧合酶-2（*COX*2）基因引物序列参见 De Moraes 等[17]；脂肪酸合成酶（*FAS*）、*Bcl*-2、*BAX*、*D*-冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8（*CASP*8）基因引物序列参见 Kamemori 等[18]；肿瘤坏死因子受体 1（*TNFR*1）基因引物序列参见 Okuda 等[19]。反应体系为 20 μL：10 μL SYBR®Premix Ex Taq™ⅡⅡ(2×)、0.8 μL 上游引物、0.8 μL 下游引物、2 μL cDNA、6.4 μL 无 RNA 酶水。反应程序：第 1 阶段 95 ℃ 30 s；第 2 阶段退火延伸 95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s，40 个循环。熔解曲线程序为 55 ℃ 30 s，41 个循环。合成的 cDNA 贮存于-20 ℃冰箱中，备用。利用 IQ5 实时定量序列检测软件（Bio-Rad versa Doc，美国 Bio-Rad）自动读取循环阈值（Ct），并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因相对表达量。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因 Genes	基因库编码 GenBank Number	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	长度 Length/bp
催乳素受体 *PRLR*	L02549	ATAGCATGGTGACCTGCATCC TCTTCGGACTTGCCCTTCTC	106
胰岛素受体 *INSR*	AY574999	CCCTTCGAGAAAGTGGTGAACA AGCCTGAAGCTCGATGCGATAG	84

Janus 激酶 2 *JAK*2	DT897449	TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	101
信号转导与转录激活子 5B *STAT*5*B*	Z72482	GCAGCTCCAGAACACGTACG CATTGTTGGCTTCTCGGACC	101
ets 结构域转录因子 5 *ELF*5	BT021517	TGCCCAACACGTCCTTCTG GGAGTCGCAAGCTGTCTGATG	101
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	DR113626	CGTTCCTCTCAACATGGACACA AGCTTCTCCGCGTCTTTACAA	101
真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 *eIF4EBP*1	BC120290	TTTGAGATGGACATTTAAAGGGC CTTGCATAAGGCCTGGCTG	101
真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 2 *eIF4EBP*2	CB446708	CAAACTGAGCATCATCCCCA CCCCGGCACCTTAATTGAA	101
核糖体 S6 蛋白激酶 *S*6*K*1	DN544771	CAAGCTTGCATGCTAATTTGTCC TTGAGTCCTGATCATGTCGAAGA	101
κ-酪蛋白 *CNS*3	BC102120	GGCGAGCCTACAAGTACACCTA GGACTGTGTTGATCTCAGGTGG	106
D-冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 *CASP*3	BC123503	AAGCCATGGTGAAGAAGGAA GGCAGGCCTGAATAATGAAA	134
环氧合酶-2 *COX*2	YP_209208.1	TGCTGAGTTTAACACGCTCTACCA TGAGACCATGTTCCAGTAAGACAGA	125
脂肪酸合成酶 *FAS*	NM_174662	TCCAGATCTCACGCAAACAG CAGTTGCCTCCCTTCATCAT	150
B 细胞淋巴瘤-2 *Bcl*-2	U92434	ATGACTTCTCTCGGCGCTAC CTGAAGAGCTCCTCCACCAC	112
B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 *BAX*	U92569	AACATGGAGCTGCAGAGGAT CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	104
肿瘤坏死因子受体 1 *TNFR*1	U90937	ACTGGTGCTTCCAGCTCTGT CTCCACCTGGAACATTTCGT	304
D-冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 *CASP*8	DQ319070	TGTCACAATCGCTTCCAGAG CCGAGGTTTGCTTGTCATTC	119
广泛表达转录蛋白 *UXT*	BC108205	TGTGGCCCTTGGATATGGTT GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	101

1.5 统计分析

每期预试期的呼吸频率、直肠温度、乳蛋白含量、乳蛋白产量、DMI 及其他主要营养物质采食量平均值作为该期试验期的协变量，用 SAS 9.3 中 Mixed 模型进行方差分析，最小二乘均数法做平均值比较。P<0.01 为差异极显著评判标准，P<0.05 为差异显著评判标准，0.05≤P<0.10 为存在趋势评判标准。

2 结　果

2.1 环境 THI 及奶牛直肠温度、呼吸频率和采食量

由表 3 可知，热应激组和配对限饲组 THI 分别为 82.4 和 64.6，热应激组极显著高于配对限饲组（P<0.01）。与配对限饲组相比，热应激组极显著提高了奶牛的呼吸频率和直肠温度（P<0.01）。由图 1 可看出，试验期热应激组 THI 日平均值均高于 72，而预试期和试验期配对限饲组低于 72。由表 3 和图 2 可知，热应激组和配对限饲组 DMI 及其他主要营养物质采食量无显著差异（P>0.05）。

表 3　环境温湿指数及奶牛直肠温度、呼吸频率和采食量

Table 3　Environmental THI and RT, RP and feed intake of cows

项目 Items	配对限饲组 PRF group	热应激组 HS group	SEM	*P* 值 *P*-value		
				分组 Grouping	时间 Time	分组×时间 Grouping×time
温湿指数 THI	64.6	82.4	0.34	<0.001	0.666	0.962
呼吸频率 RR/（次/min）	33.3	77.8	0.31	<0.001	0.440	0.111
直肠温度 RT/℃	38.5	40.0	0.12	0.001	0.171	0.202
干物质采食量 DMI/kg	10.1	10.2	0.94	0.892	<0.001	0.654
粗蛋白采食量 CP intake/kg	1.70	1.59	0.165	0.558	<0.001	0.501
粗脂肪采食量 EE intake/kg	0.25	0.24	0.025	0.552	<0.001	0.585
中性洗涤纤维采食量 NDF intake/kg	4.71	4.42	0.454	0.556	<0.001	0.578
酸性洗涤纤维采食量 ADF intake/kg	2.53	2.37	0.246	0.555	<0.001	0.568

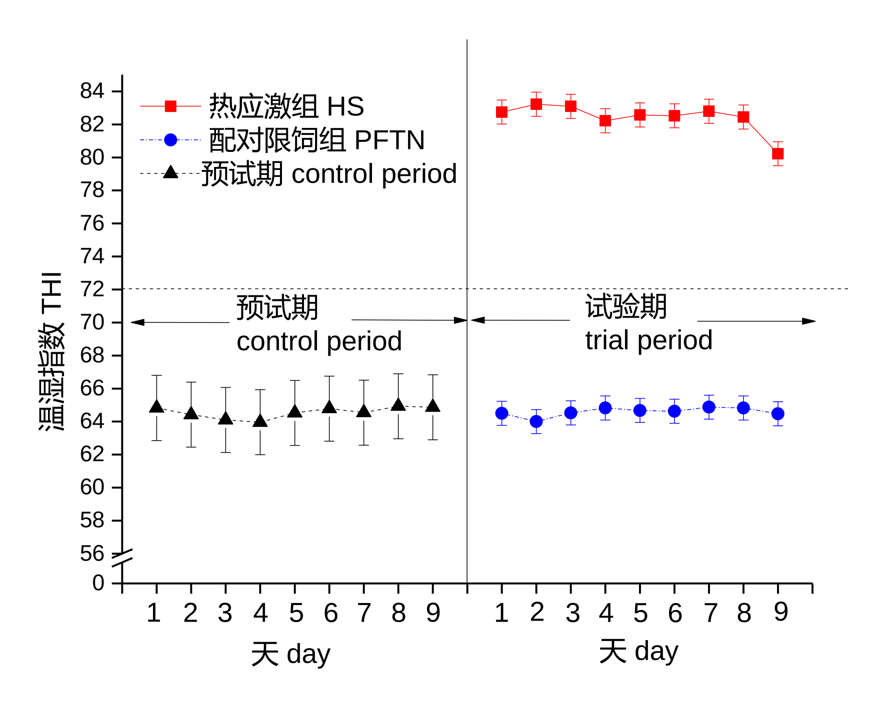


图 1　预试期和试验期 THI 日平均值

Fig.1　Daily mean of THI during pretrial period and trial period

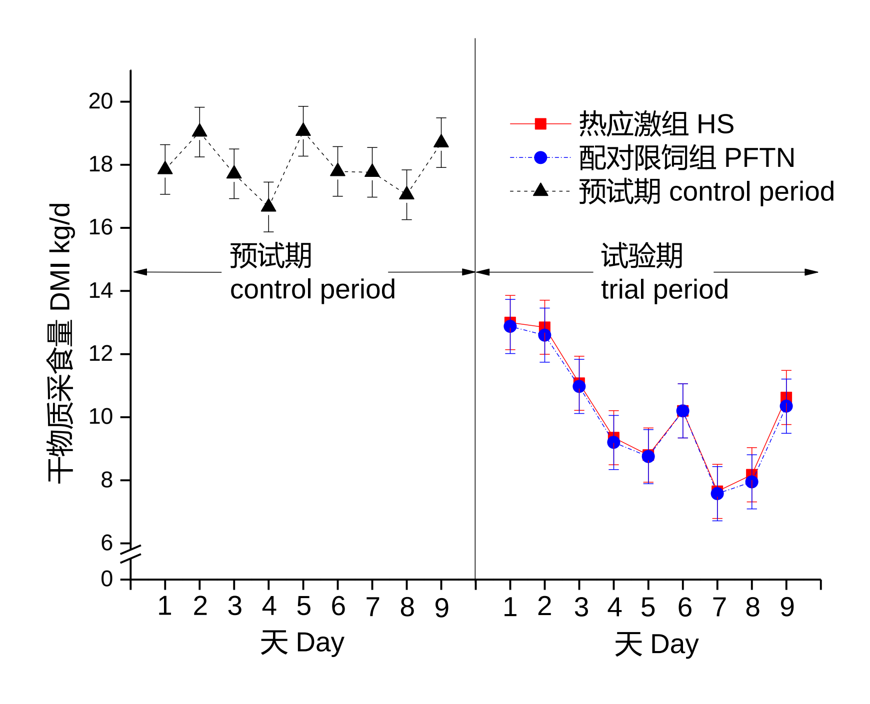


图 2 预试期和试验期 DMI 日平均值

Fig.2 Daily mean of DMI during pretrial period and trial period

2.2 热应激对乳蛋白含量和产量的影响

由表 4 可知，与配对限饲组相比，热应激组极显著降低了乳蛋白含量和产量（*P*<0.01）。

表 4 热应激对乳蛋白含量和产量的影响

Table 4 Effects of heat stress on milk protein content and yield

项目 Items	配对限饲组 PRF group	热应激组 HS group	SEM	*P* 值 *P*-value		
				分组 Grouping	时间 Time	分组×时间 Grouping×time
乳蛋白含量 Milk protein content/%	2.68	2.57	0.029	0.038	<0.001	0.436
乳蛋白产量 Milk protein yield/（g/d）	695	572	38.4	0.048	<0.001	0.378

2.3 热应激对泌乳相关血液激素含量的影响

由表 5 可知，热应激组奶牛血液中 GH、INS、PRL 及 IGF-1 含量与配对限饲组差异不显著(*P*>0.05)。

表 5 热应激对泌乳相关血液激素含量的影响

Table 5 Effects of heat stress on blood hormone contents involved in lactation

项目 Items	配对限饲组 PRF group	热应激组 HS group	SEM	*P* 值 *P*-value		
				分组 Grouping	时间 Time	分组×时间 Grouping×time
生长激素 GH/（ng/mL）	7.79	8.94	1.678	0.545	0.021	0.896
胰岛素 INS/（mIU/L）	31.59	37.27	5.296	0.362	0.004	0.519

类胰岛素样生长因子 1 IGF-1/（μg/L）	28.69	27.35	3.396	0.719	0.589	0.631
催乳素 PRL/（ng/mL）	380.52	327.79	94.149	0.608	0.208	0.965

2.4 热应激对乳腺细胞中 JAK-STAT 和 mTOR 信号通路表达量的影响

由表 6 可知，相对于配对限饲组，热应激组显著提高了 *PRLR* 基因表达量（$P<0.05$），而对 *INSR* 基因表达量的影响不显著（$P>0.05$）。热应激对 JAK-STAT 通路基因（*JAK*2、*STAT*5*B*、*ELF*5）表达量的影响不显著（$P>0.05$），对 mTOR 通路基因（*mTOR*、*eIF*4*EBP*1、*eIF*4*EBP*2、*S*6*K*1）中 *mTOR* 和 *S*6*K*1 基因表达量有显著的影响（$P<0.05$）或有显著影响的趋势（$0.05\leq P<0.10$）。与配对限饲组相比，热应激显著提高了 *mTOR* 基因表达量（$P<0.05$），且有提高 *S*6*K*1 基因表达量的趋势（$0.05\leq P<0.10$），对 *eIF*4*EBP*1 及 *eIF*4*EBP*2 的基因表达量没有显著的影响（$P>0.05$）。

表 6 热应激对 JAK-STAT 和 mTOR 信号通路基因表达量的影响

Table 6 Effects of heat stress on gene expressions of JAK-STAT and mTOR pathways

项目 Items	配对限饲组 PRF group	热应激组 HS group	SEM	*P* 值 *P*-value 分组 Grouping	分组×时间 Grouping×time
催乳素受体 *PRLR*	1.00	1.60	0.175	0.027	0.016
胰岛素受体 *INSR*	1.00	1.08	0.217	0.756	0.393
Janus 激酶 2 *JAK*2	1.00	1.08	0.156	0.648	0.434
信号转导与转录激活子 *STAT*5*B*	1.00	1.34	0.636	0.617	0.433
ets 结构域转录因子 5 *ELF*5	1.00	1.00	0.427	0.997	0.578
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	1.00	1.39	0.040	0.011	0.521
真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 *eIF*4*EBP*1	1.00	1.38	0.637	0.583	0.857
真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 2 *eIF*4*EBP*2	1.00	1.23	0.518	0.684	0.412
核糖体 S6 蛋白激酶 *S*6*K*1	1.00	1.33	0.094	0.071	0.332
κ一酪蛋白 *CNS*3	1.00	0.86	0.212	0.567	0.604

2.5 热应激对乳腺细胞中细胞凋亡相关基因表达量的影响

由表 7 可知，与配对限饲组相比，热应激组提高了乳腺细胞中 *CASP*3（$P<0.05$）、*COX*2（$P<0.05$）和 *BAX* 的基因表达量（$0.05\leq P<0.10$），而对 *FAS*、*Bcl*-2、*TNFR*1 和 *CASP*8 基因表达量影响不显著（$P>0.05$）。

表 7 热应激对细胞凋亡相关基因表达量的影响

Table 7 Effects of heat stress on expression of gene involved in apoptosis

项目 Items	配对限饲组 PRF	热应激组 HS group	SEM	*P* 值 *P*-value 分组	分组×时间

	group			Grouping	Grouping×time
天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 *CASP*3	1.00	2.64	0.293	0.031	0.687
环氧合酶-2 *COX*2	1.00	3.82	0.647	0.049	0.478
脂肪酸合成酶 *FAS*	1.00	1.47	0.218	0.167	0.926
B 细胞淋巴瘤-2 *Bcl*-2	1.00	1.00	0.277	0.991	0.243
B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 *BAX*	1.00	1.30	0.067	0.059	0.043
肿瘤坏死因子受体 1 *TNFR*1	1.00	1.16	0.108	0.282	0.126
D-天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 *CASP*8	1.00	1.01	0.194	0.951	0.168

3 讨 论

当 THI 超过 72 时奶牛的生产性能开始出现明显下降，故将 72 作为热应激的 THI 阈值[13]。然而 Zimbleman 等[20]研究发现，当 THI 超过 68 时高产奶牛已经开始出现热应激反应，且当 THI 等于 68 时每 24 h 产奶量下降 2.2 kg。本研究中，试验期热应激组平均 THI 为 82.4，且试验期每天 THI 平均值均高于 72，而预试期和试验期配对限饲组每天 THI 平均值均低于 68，满足热应激组和非热应激组的 THI 要求。与配对限饲组相比，热应激显著提高了奶牛的呼吸频率和直肠温度。综合以上数据可知，本试验的热应激和非热应激模型构建成功。

大量研究表明，当 THI 高于 72 时会引起奶牛 DMI 的下降[21-22]，同时引起乳蛋白含量下降[23]，降低乳品质。进一步的研究发现，热应激时 DMI 的下降只能解释部分乳蛋白下降[10-12]，剩余部分的乳蛋白下降由热应激直接引起。本研究中热应激组与配对限饲组的乳蛋白含量和产量均随着热应激时间的延长而下降，但配对限饲组的乳蛋白含量在试验期的最后 2 d 有升高的趋势，这可能与产奶量下降后乳蛋白的浓缩有关。综合以上数据提示，热应激通过 DMI 下降引起乳蛋白下降的同时还会通过其他途径引起乳蛋白的降低。

乳蛋白的合成受到激素的调控和驱动[4]，其中主要包括 GH、PRL、INS 及 IGF-1[5]。GH 对促进生长发育及泌乳有重要的作用，主要通过调节机体能量平衡及增加机体蛋白质的合成来产生作用[24]。PRL 的主要作用是促进乳腺生长发育、发动和维持泌乳。INS 是由胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白质激素，是机体内唯一降低血液 GLU 的激素，同时促进糖原、脂肪、蛋白质的合成。研究表明，增加血液中 INS 含量可明显增加乳腺血流量，提高产奶量[25-26]。IGF-1 除可作为 GH 发挥作用的中介物质以外，还可通过作用于其受体介导的信号通路促进乳腺上皮细胞增殖和腺泡的形成[27]。

目前关于热应激对泌乳相关激素影响的报道不完全一致。宋代军等[28]研究表明，各热应

激期泌乳前、中期奶牛血清 INS 含量有下降的趋势，这与 Herbein 等[29]的研究结果一致，然而 Itoh 等[30]研究发现，热应激可显著提高泌乳期奶牛血液 INS 含量。宋代军等[28]研究表明，泌乳前、中、后期的奶牛在热应激期的血清 PRL 的含量均低于非热应激期，然而朱国标等[31]却得到相反的结果。热应激对 GH 的影响，目前研究基本一致，热应激可降低奶牛血液中 GH 的含量或有降低的趋势[11,32-33]。热应激对 IGF-1 的影响并没有太多的报道，Rhoads 等[11]认为热应激可降低 IGF-1 的含量，而 McGuire 等[33]研究发现热应激对 IGF-1 含量并没有显著影响。本研究中，和配对限饲组相比，热应激对血液 GH、INS、PRL、IGF-1 含量并没有显著影响，这可能与试验动物的数量较少有关。

乳蛋白基因表达的过程主要包括 DNA 的转录和 mRNA 的翻译。研究发现，PRL、INS、GH、糖皮质激素、IGF-1 等对泌乳有直接或间接的影响，主要通过 JAK-STAT 和 mTOR 等信号通路作用于转录和翻译的起始及延伸阶段来调控蛋白质的合成[5]。PRL 或 GH 与相应的受体结合后引起受体分子的二聚体化，这使得与受体偶联的 JAK 相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化作用而活化。JAK 激活后催化受体上的酪氨酸残基发生磷酸化修饰，继而这些磷酸化的酪氨酸位点与周围的氨基酸序列形成“停泊位点（docking site）”，同时 STAT5 蛋白被招募到这个“停泊位点”。最后，JAK 催化结合在受体上的 STAT5 蛋白发生磷酸化修饰，活化的 STAT5 以二聚体的形式进入细胞核内与 γ 干扰素激活序列（GAS）位点结合，诱导 *ELF*5、*SOCS*1、*SOCS*2 和乳蛋白基因的转录，其中 ELF5 在调节乳腺中 STAT5 活性方面发挥着重要作用[34-36]。mTOR 通路中起主要作用的是 mTOR 复合物 1（mTORc1），mTORc1 可以磷酸化 *eIF*4EBP 的某些位点，使其与真核翻译起始因子（eIF）4E 解离，使 eIF4E 可以与 eIF4G 和 eIF4A 结合形成 eIF4E•eIF4G•eIF4A 复合物。eIF4E•eIF4G•eIF4A 复合物被认为对含有 5ˊ端非翻译区（5ˊ-UTR）二级结构的 mRNA 的翻译有重要作用[37]，因为 eIF4A 可使 5ˊ-UTR 的二级结构解旋，有利于跳读过程的进行，使核糖体能够快速定位到 mRNA 的起始密码子，从而促进翻译的进行。mTORc1 可介导 S6K1 的磷酸化，S6K1 可磷酸化核糖体 S6（rpS6）、eIF4B、SKAR（S6K1 Aly/REF-like target）和真核细胞翻译延长因子 2（eEF2）激酶，进而影响 mRNA 翻译的起始和延伸阶段[38]。

热应激对奶牛乳腺细胞中 JAK-STAT 和 mTOR 通路的影响目前尚未见报道。Yoshihara 等[39]在老鼠上的研究表明热应激对 *mTOR* 和 *eIF4EBP*1 基因表达量并没有显著的影响。在人

肌肉细胞上的研究表明，热应激可增加 mTOR、S6K1 的磷酸化水平，降低 eIF4EBP1 的磷酸化水平，但在热应激 1 h 后 eIF4EBP1 磷酸化水平恢复到热应激之前的水平[40]。本研究中，热应激对 JAK-STAT 通路基因表达量并没有显著的影响，但是显著增加了 *mTOR* 基因的表达量，并有增加 *S6K*1 基因表达量的趋势。本研究中热应激对于 *CSN*3 基因的表达量并没有显著的影响，然而胡菡等[9]在体外培养奶牛乳腺上皮细胞上研究发现，热应激可降低乳腺上皮细胞中乳蛋白 αS1-酪蛋白和 β-酪蛋白的基因的表达量，试验结果的不同可能与体内试验和体外培养细胞的差异以及热应激的程度（胡菡等[9]：42 ℃，本研究：平均直肠温度 40.0 ℃）不同造成。综合以上数据，提示热应激可能并没有通过 JAK-STAT 和 mTOR 通路影响乳蛋白的合成，且 *CSN*3 基因的表达量可能并没有受到热应激的显著影响。

大量研究表明，热应激能降低细胞的活力,诱导细胞凋亡[6-8]。通过体外培养乳腺细胞，周振峰等[7]发现高温抑制乳腺上皮细胞正常生长，促使细胞凋亡，胡菡等[9]发现热应激上调了乳腺细胞中促凋亡基因 *BAX* 的表达量，而抑制凋亡基因 *Bcl*-2 先上调后下调。限于无法直接测定活体乳腺组织中乳腺细胞凋亡数量，本研究选择了几个和细胞凋亡相关的基因，通过实时定量 PCR 分析相关基因表达量来了解热应激对乳腺细胞凋亡的影响。研究发现，热应激显著增加了乳腺细胞中与细胞凋亡相关的基因 *CASP*3、*COX*2 的表达量，且有增加 *BAX* 表达量的趋势，而抑制凋亡基因 *Bcl*-2 的表达量并未受到影响，提示热应激可能降低了活体乳腺组织中乳腺细胞的活力，促进了乳腺细胞的凋亡。

综合得出，与配对限饲组相比，热应激降低了乳蛋白的含量和产量，而与乳蛋白合成相关的信号通路（JAK-STAT和mTOR通路）的基因表达量并没有下降，提示热应激可能并没有通过JAK-STAT和mTOR通路影响乳腺细胞合成乳蛋白的能力。与体外研究的结果[9]一致的是，热应激增加了活体乳腺细胞中与细胞凋亡相关的基因（*CASP*3、*COX*2、*BAX*）的表达量或有增加的趋势，显示热应激可能诱导了活体乳腺细胞的凋亡。综合考虑，热应激可能并不是通过调控单个乳腺细胞合成乳蛋白的能力来影响乳蛋白的含量和产量，而是通过诱导乳腺细胞的凋亡，减少可用于乳蛋白合成的乳腺细胞的数量来影响乳蛋白的含量和产量。

但是由于目前研究技术的限制，不能活体检测奶牛乳腺组织中乳腺细胞凋亡的情况，尚不能充分证明热应激可诱导活体乳腺细胞的凋亡，需要进一步的改进和提升研究技术，进一步研究热应激引起乳蛋白下降的原因，为采取相关措施缓解热应激引起的乳蛋白下降提供理

论依据。

4 结 论

热应激可能并不是通过调控单个乳腺细胞合成乳蛋白的能力来影响乳蛋白的含量和产量，而是通过诱导乳腺细胞的凋亡，减少可用于乳蛋白合成的乳腺细胞的数量来影响的。

参考文献：

[1] BERNABUCCI U,BASIRICÒ L,MORERA P,et al.Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows[J].Journal of Dairy Science,2015,98(3):1815–1827.

[2] MCDOWELL R E,MOODY E G,VAN SOEST P J,et al.Effect of heat stress on energy and water utilization of lactating cows[J].Journal of Dairy Science,1969,52(2):188–194.

[3] 马露,卜登攀,高胜涛,等.热应激影响奶牛乳腺酪蛋白合成的机制[J].动物营养学报,2015,27(11):3319–3325.

[4] NEVILLE M C,MCFADDEN T B,FORSYTH I.Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion[J].Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,2002,7(1):49–66.

[5] BIONAZ M,LOOR J J.Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle[J].Bioinformatics and Biology Insights,2011,5:83–98.

[6] 童娜.热应激对草鱼肾细胞凋亡的影响[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2014.

[7] 周振峰,崔瑞莲,王加启,等.热应激对体外培养奶牛乳腺上皮细胞生长、凋亡及其热休克蛋白mRNA转录的影响[J].畜牧兽医学报,2010,41(5):600–607.

[8] 蔡亚非,李莲,刘庆华,等.热应激奶牛外周血淋巴细胞凋亡和*BAX-α*基因表达[J].南京农业大学学报,2005,28(1):66–70.

[9] 胡菡,王加启,李发弟,等.高温诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞的应激响应[J].农业生物技术学报,2011,19(2):287–293.

[10] BANDARANAYAKA D D,HOLMES C W.Changes in the composition of milk and rumen contents in cows exposed to a high ambient temperature with controlled feeding[J].Tropical Animal Health and Production,1976,8(1):38–46.

[11] RHOADS M L,RHOADS R P,VANBAALE M J,et al.Effects of heat stress and plane of

nutrition on lactating Holstein cows:Ⅰ.Production,metabolism,and aspects of circulating somatotropin[J].Journal of Dairy Science,2009,92(5):1986–1997.

[12] COWLEY F C,BARBER D G,HOULIHAN A V,et al.Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism[J].Journal of Dairy Science,2015,98(4):2356–2368.

[13] ARMSTRONG D V.Heat stress interaction with shade and cooling[J].Journal of Dairy Science,1994,77(7):2044–2050.

[14] NRC.Nutrient requirements of dairy cattle[M].7th ed.Washington,D.C.:The National Academies Press,2001.

[15] 王加启.反刍动物营养学研究方法[M].北京:现代教育出版社,2011.

[16] VAN SOEST P J,ROBERTSON J B,LEWIS B A.Methods for dietary fiber,neutral detergent fiber,and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3583–3597.

[17] DE MORAES C N,MAIA L,DE LIMA P F,et al.Temporal analysis of prostaglandin F2α receptor,caspase 3,and cyclooxygenase 2 messenger RNA expression and prostaglandin F2α receptor and cyclooxygenase 2 protein expression in endometrial tissue from multiparous Nelore (*Bos taurus indicus*) cows treated with cloprostenol sodium during puerperium[J].Theriogenology,2015,83(2):276–284.

[18] KAMEMORI Y,WAKAMIYA K,NISHIMURA R,et al.Expressions of apoptosis-regulating factors in bovine retained placenta[J].Placenta,2011,32(1):20–26.

[19] OKUDA K,SAKUMOTO R,OKAMOTO N,et al.Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor-α (TNF),TNF receptor types Ⅰ and Ⅱ in bovine endometrium[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2010,330(1/2):41–48.

[20] ZIMBLEMAN R B,RHOADS R P,RHOADS,M L,et al.A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows[C]//Proceedings of the 24th annual southwest nutrition conference.Arizona:Department of Animal Sciences,the University of

Arizona,2009.

[21] 艾阳,曹洋,谢正露,等.热应激时奶牛血液中游离氨基酸流向与乳蛋白下降的关系研究[J].食品科学,2015,36(11):38–41.

[22] 程建波,王伟宇,郑楠,等.自然生产条件下热应激周期变化揭示泌乳中期奶牛出现“热应激乳蛋白降低征”[J].中国畜牧兽医,2014,41(10):73–84.

[23] WEST J W,MULLINIX B G,BERNARD J K.Effects of hot,humid weather on milk temperature,dry matter intake,and milk yield of lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2003,86(1):232–242.

[24] JOHNSON H D,VANJONACK W J.Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals[J].Journal of Dairy Science,1976,59(9):1603–1617.

[25] BARBER M C,TRAVERS M T,FINLEY E,et al.Growth-hormone-prolactin interactions in the regulation of mammary and adipose-tissue acetyl-CoA carboxylase activity and gene expression in lactating rats[J].Biochemical Journal,1992,285:469–475.

[26] BASSETT N S,CURRIE M J,BREIER B H,et al.The effects of ovine placental lactogen and bovine growth hormone on hepatic and mammary gene expression in lactating sheep[J].Growth Hormone & IGF Research,1998,8(6):439–446.

[27] 王皓宇,秦彤,郝海生,等.胰岛素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂肪合成相关基因mRNA表达的影响[J].畜牧兽医学报,2013,44(5):710–718.

[28] 宋代军,何钦,姚焰础.热应激对不同泌乳阶段奶牛生产性能和血清激素浓度的影响[J].动物营养学报,2013,25(10):2294–2302.

[29] HERBEIN J H,AIELLO R J,ECKLER L I,et al.Glucagon,insulin,growth hormone,and glucose concentrations in blood plasma of lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,1985,68(2):320–325.

[30] ITOH F,OBARA Y,ROSE M T,et al.Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure[J].Journal of Animal Science,1998,76(8):2182–2189.

[31] 朱国标,辛火,李继红,等.高热与皮质醇、泌乳素、LPO及SOD的关系[J].中国公共卫生学报,1994,13(4):218–219.

[32] MOHAMMED M E,JOHNSON H D.Effect of growth hormone on milk yields and related physiological functions of Holstein cows exposed to heat stress[J].Journal of Dairy Science,1985,68(5):1123–1133.

[33] MCGUIRE M A,BEEDE D K,COLLIER R J,et al.Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin,insulin-like growth factor (IGF)-Ⅰ and IGF-Ⅱ,and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows[J].Journal of Animal Science,1991,69(5):2050–2056.

[34] LIU X,ROBINSON G W,HENNIGHAUSEN L.Activation of STAT5A and STAT5B by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation[J].Molecular Endocrinology,1996,10(12):1496–1506.

[35] HENNIGHAUSEN L,ROBINSON G W.Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B[J].Genes & Development,2008,22(6):711–721.

[36] SHEKAR P C,GOEL S,RANI S D S,et al.Kappa-casein-deficient mice fail to lactate[J].Proceedings of the National Academy of Sciences,2006,103(21):8000–8005.

[37] IADEVAIA V,HUO Y L,ZHANG Z,et al.Roles of the mammalian target of rapamycin,mTOR,in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis[J].Biochemical Society Transactions,2012,40(1):168–172.

[38] KIMBALL S R,JEFFERSON L S.New functions for amino acids:effects on gene transcription and translation[J].The American Journal of Clinical Nutrition,2006,83(2):500S-507S.

[39] YOSHIHARA T,NAITO H,KAKIGI R,et al.Heat stress activates the Akt/mTOR signaling pathway in rat skeletal muscle[J].Acta Physiologica,2013,207(2):416–426.

[40] KAKIGI R,NAITO H,OGURA Y,et al.Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle[J].Journal of Physiological Sciences,2011,61(2):131–140.

Heat-Stress Decreases Milk Protein through Induction of Mammary Cells Apoptosis of Cows

GAO Shengtao[1] GUO Jiang[1] QUAN Suyu[1] NAN Xuemei[1] BU Dengpan[1,2,3*]

（1. *State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*; 2. *CAAS-ICRAF Joint Laboratory on Agroforestry and Sustainable Animal Husbandry*, Beijing 100081, China; 3. *Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Harbin* 150030, *China*）

Abstract: This experiment was conducted to investigate the relationship among the decrease of milk protein content and yield under heat stress, hormones related to lactation, pathways involved in milk protein synthesis, and apoptosis of mammary cells, and to find reasons for milk protein decline caused by heat stress. Four healthy multiparous lactating Holstein cows with similar days in milk, body weight and milk yield were used as experiment animals. Crossover design was applied, there were two experimental periods, and each period lasted for 18 days (9 d of pretrial period, and 9 d of trail period) with 30 d between the two periods. Cows in pretrial period were exposed to thermal neutral conditions and allowed to eat ad libitum. Cows in trial period were randomly divided into two groups （$n=2$）， which were heat stress group and pair-restricted feeding group. The results showed as follows: 1) heat stress significantly decreased milk protein yield and content ($P<0.01$). 2） Heat stress had no significant influence on Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway and κ-casein (*CSN*3) gene expression ($P>0.05$). 3) In mTOR pathway, heat stress significantly increased the expression of mammalian target of rapamycin (*mTOR*) gene ($P<0.05$), and had the tendency to increase the expression of ribosomal protein S6 kinase (*S6K*1) gene ($0.05\leq P<0.10$). 4) Heat stress significantly increased the expressions of Caspase-3 (*CASP*3) and cyclooxygenase-2 (*COX*2) genes involved in apoptosis ($P<0.05$), and had the tendency to increase the expression of B-cell lymphoma-2-associated X protein（*BAX*）($0.05\leq P<0.10$). It is concluded that heat stress may not be able to decline milk protein content and yield through regulating the capacity of individual mammary cells, but thorough induction of apoptosis of the mammary cells and decrease of the quantity of mammary cells used for milk protein synthesis.

Key words: heat stress; milk protein; JAK-STAT; mTOR; apoptosis